

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭63-119500

⑬ Int.Cl.² ⑭ 出願番号 ⑮ 庁内整理番号 ⑯ 公開 昭和63年(1988)5月24日
 C 07 K 15/14 8318-4H
 A 61 K 31/725 ABL 7252-4C 滋養成分 未請求 発明の頁 5 (全13頁)
 ABY

⑰ 発明の名称 硫酸化多糖体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑱ 特 願 昭62-125443

⑲ 出 願 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑳ 昭61(1986)5月23日㉑ 日本(JP)㉒ 特願 昭61-118847

⑳ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉑ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉒ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉓ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名
 最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース環基)

1. 発明の名称 蛋白含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

硫酸化多糖体DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲 (4) 比旋光度 (α)_D²⁰ -37° ± 1° (0.5%水溶液)

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硫酸化多糖体DS 4152。 (5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯 1240, 840(肩), 810(α⁻¹; K₂Cr₂O₇)

(1) 分子量(ゲルろ過法による) 20000 ± 3000 (6) 溶解性 水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、ノタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(2) 元素分析値 C 24.2~26.7% H 3.34~3.98% N 0.51~0.89% S 10.6~11.7% P 0.77~1.06% (7) 着色反応 フェノール-硫酸法、アンスロシ-硫酸法、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応

(3) 糖および蛋白質の含量 糖含量(%) : 87 ± 3 (フェノール-硫酸法、

特開昭63-119500(2)

は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびムンヒフリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陽性。

(11) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(12) 糖成分および炭酸基、窒素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 $10\text{H}_2\text{O}$

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

(13) 糖アミノ酸およびアミノ糖

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノビリン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

次の薬効第5項記載の血管新生抑制剤。

2. 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する炭酸基剤。

3. 炭酸の作用を説明

(炭酸上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体DP 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び炭酸基剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び炭酸基剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、(1)プロコパス(19)AT-28の炭酸基生物中に炭酸基作用、炭酸基作用およびインターフェロン誘発作用を有する炭酸化多糖体DP 4639 が存在することが知られて

2. 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、増殖性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する炭酸基剤。

2. 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

4. ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステノイド類から選ばれたものである特許請求の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、増殖性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25320号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体DP 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねた結果、DP 4639 が強い免疫性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この免疫性を生ずべく、更に研究をかねたところ、DP 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDP 4152 と名づけられた一成分は免疫性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び炭酸基作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを混合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が増強的に増進されることを見出した。

本発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規な阻酸化多環体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、阻酸化多環体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、阻酸化多環体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、迄の

発育、発育形態、創傷の治癒等に際して重要だけでなく、白血病、多発性骨髄腫、免疫記憶、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑えることをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する腫瘍症、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の阻酸化多環体DS 4152は、アルスロパクター 19-AT-25 (工業技術院生

物工業技術研究所には、Microsome 19-AT-25として、FERM P-5255及びAntibacterial 19-AT-25としてFERM SP-13570の番号で登録されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量の 1.5×10^4 以上の阻酸化物質等を通常の分子重量分離法、例えばゲルろ過法や吸着ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を通常のゲルろ過媒体、例えば、セファクリル (Sepharcl 8-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフイ

ー (東洋ソーダ製03000 SWコラム使用)を行い、排液限界(ポイド・ポリマー、void volume)にピークを示すフラクション(20分)とポイド・ポリマーにピークを与えず分子量の $3 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(15分)を各々集め、透析する。

また、限外ろ過法を施す(例えばAmicon社のYM10、YM30、XM50、PM30やMillon社のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはメリスクリフタ(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5.0/cm²程度)し、透過液もDS 4152として集めればよい。使用溶媒は、水-エタ

特開第63-119300(4)

ノール(10:2~3)または水が過剰であり、4で乃至重縮を行なうのが一般的である。

得られた各透析液を蒸留後ろ過し、ろ液を既定量のエタノール中に沈降下注ぐことにより生成する白色沈澱を乾燥、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とする08 4152(1成分)と脂溶性物質(2成分)が各々得られる。

こうして得られる08 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

22000±3000

(2) 元素分析値(元素分析の結果を示す)

ルン、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-靛藍、アンスロン-靛藍、ビムレフト反応およびローリー・フタリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびムンヒフリン反応も陽性。カルベソール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、3,6-NaおよびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(10) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 57±3(フェノール-靛藍法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%): 1±0.5(ローリー・フタリン法、牛血清アルブミン標準)

(11) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(12) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収有

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(13) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(14) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイロヒドロキシ酸、グルコサミンおよびムンリン酸の存在を認める。

炭上の08 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、08 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

炭酸、アロピロソロン、6-メチルアロピロソロン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、海綿状炭酸、骨角質、ヘムス

一環に実験的に調製された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer, Res. 39 1308(1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769(1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176(1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄激素コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Cancer Res. 10 72(1984))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート、フオスフェート、アタルアセテート、ナトラヒドロフルレート、トリメタルアセテート等)；メタルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート等)；メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフェート、メレレート等)が挙げられる。

また、フルコホルチコイドC-11位の水素がα配位になった異性体(たとえば、11α-エピヘイロコチゾン)も含まれるし、前記フルコホルチコイドのナトラヒドロ化物(フルコホルチコイド誘導体の有無は関係ない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄激素コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的に次のものが例示される。

- (1) プレドニンを母核とするステロイドホルモンの、すなわちフルコホルチコイドであり、たとえばコチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンダシレート等)；ヘイロコチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)、ダイドロゲステロンおよびその17α-アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メタロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメタルアセテート、エナンテート、フエメルプロピオネート等)も挙げられる。

- (2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモンの、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、アタレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストステロンおよび

その誘導体、ヒドコステロンがあげられる。

さらにフルオキシノステロンおよびその誘導体、メタルステロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、妊娠ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、クンダセノエート等）、エストリオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を薬学的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の増液用剤中に溶解させた散剤、錠剤、錠剤

剤、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して混合剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし調剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、粘膜内、お陰内、尿道、皮下、直腸内、結膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイド剤は男性ホルモン用、副腎コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが通常で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが通常

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が通常である。

また、本発明の血管新生抑制剤を賦形剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明のDS 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と混合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、DS 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と混合したものとは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開56-67301号に記載の方法により得られたDP 4639 (50%) を1.5mlの0.1M NaCl に溶解し、これを0.1M NaCl で平衡化したカラム（セファタリルS-300；50×80cm）にかけて同濃度にて溶出し、1.8mlずつ溶出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル透過クロマトグラフィー（東洋ソーブ製 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ギイフ・ドリュームにピークを与えず、

特開第63-119500(7)

03 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を0F 4639 とし、その成分と比較して示す。

(4) 糖、蛋白、SおよびP含量(表1換)

表1換

	1)	2)	3)	4)
	糖(%)	S(%)	蛋白(%)	P(%)
03 4152	56	1.11	1.1	0.88
0F 4639	54	1.08	1.3	0.86
成分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-硫酸法(ガラクトース換算)

2) アントノビラスの方法(C.A. Antonopoulos, *Acta Chem. Scand.* 16, 1521 (1962)) による

3) モーリー-フォリン法(半血清アルブミン換算)

4) テエンらの方法(P. S. Tean et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956)) による。

分子量(ゲルペルメータシオン)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に抽出されるフラクションを調り(約700ml)、炭イオン水に対して透析した。透析液を約50mlで交換して通じた。ろ液を約400mlのエタノール中へ浸漬下置して、生成した沈殿を調り、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃, 6時間)して目的物の03 4152 の白色粉末3.6gを得た。

一方、上記高濃度ゲル浸透クロマトグラフィーでマイド・ポリマーにピークを与えるフラクションを調り(約90ml)、上述の03 4152 の場合と同様に処理して、成分を白色粉末として0.18gを得た。

(4) ガラクトース、グルコース、炭素および糖の組成率

液体を1規定炭素中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で炭素処理した後、炭素によりアルシトールアセテートとしてガス chromatographyで分析した。また、炭素炭素および糖の組成率は、SおよびPの含量(%)から算出した。

表2換

	ガラクトース	グルコース	炭素	糖
03 4152	61	10	73	0.6
0F 4639	62	10	73	0.6
成分	62	10	69	0.6

表2換は、グルコースを10molとした場

合の各成分のmol比の1例である。

(4) 糖のアミノ酸およびアミノ糖の同定

03 4152 を3規定炭素中、100℃で18時間加水分解した後、炭素によりアミノ酸分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ソアミノピロリン酸、グルコサミンおよびムリン酸のピークを認め、

(4) 比較炭素: (a) $\frac{1}{2}$ (b=0.5, 水)

表3換

	比較炭素
03 4152	-37
0F 4639	-36
成分	-34

(4) ゲルろ過層出パターン

表1換、表2換および表3換に、それぞれ

特開63-119500 (B)

あると推定される。

(N) 同毒性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行った同毒性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

DS 4152, DF 4630 およびE部分の高濃度アルブミンゲル電泳法による示す(互換ソーブ) 0.3000 M カラム使用、移動度0.1 M 酢酸カリウム緩衝液、pH 6.5、0.9 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 紫外線吸収スペクトル

2 ml/1%水溶液において220~340 nm に極大吸収は認められず。

(ii) 紫外線吸収スペクトル (IR 法)

1240, 840 (肩) および810 cm^{-1} に、炭水化物に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェosphateを介してメチルグリカン部の結合した炭水化物で

第4表

試料	用量 mg/10ml	体積上昇率 (%)				
		0.20	0.10	0.05	0.025	0.0125
DS 4152	75	0.20	0.10	0.05	0.025	0.0125
DF 4630	375	0.20	0.05	0.025	0.0125	0.00625
	15	1.55	1.25	1.40	1.60	1.80
	75	1.40	2.00	1.40	2.20	2.60
	15	1.60	1.40	2.20	2.60	3.20
	75	1.60	1.75	2.65	3.20	3.80

・+ (陽性), - (陰性)

(i) DS 4152 の急性毒性 (マウス、静注) は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であった。

実施例1 (例)

DF 4630 (0.01) を300 mlの水-エタノール (10:3) 溶液に溶解し、TM10 膜 (4.18 μm , アICON社製) を用いて、室温で加圧 (1.5 kg/cm²) 下、真空中限外ろ過した。上記溶液を通過しながら透過液量が約3.4となるまで実施した。透過液の濃縮液 (約50 ml) に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ沈降下ろした。生成した沈降物を集め、90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (55℃, 5時間) してDS 4152

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
炭素、S及びPの含量を除き、実用例1(4)の
DS 4152 と同一であった。

炭素量 58%
S含量 11.3%
炭素含量 99%
P含量 99.2%

高速ゲル浸透クロマトグラムを第4図に示す
(0.3000 Mカラム、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5)、0.8 M/分)。

実用例2

局所収縮血管新生阻止試験(直接法)：

局所を用い、タイラーとフォーマン

(Nature 297:307,(1982))の方法を—

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 mg /局所の量(血管新生に影響のない量)を用いた。また、比較として、DP 4639
及びE部分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(10₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E部分
10 ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実用例4

実用例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用による10₅₀値の变化を検討した。この結果、図4のステロイドに10

特開63-119500 (9)

図改良した以下の方法で行った。

局(ノーランクロス)の4~5日の受作用
の収縮期に、生理食塩水で洗浄したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

高濃度加2日後に、収縮期血管の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、
ニヒト法により、50%血管新生阻止量
(10₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 の10₅₀値
は、100 mgである。これに対し、ヘパ
リンは、100 mgでも作用を示さなかった。

実用例3

局所収縮血管新生阻止試験(直接法)：

実用例2と同様に、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの局
所収縮血管新生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなった(第6表)。

第6表

ステロイド	10 ₅₀ 値(mg/局所)	
	単 独	DS 4152 (増加) と併用 (倍率)
コルチゾンアセテート	120	Q17 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	Q16 (69)
プレニソロン	130	Q08 (163)
6α-メチルプレニソロン	115	Q03 (383)
メチルプレニソロン	Q80	Q05 (160)
テトラハイドロ	100	Q01 (1000)
プロゲステロン	102	Q49 (21)
17β-エトキシプロゲステロンアセテート	112	Q42 (27)
17β-エトキシノール	198	Q28 (70)
フルオキシメチステロン	124	Q12 (103)
5α-アンドロステロン	232	Q29 (8)

実施例5

血管新生阻止作用(%)の測定法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%フェンチナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受胎期卵巣組織に添加し、2日後に判定した。この結果を図7表に示す。

表7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-5.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	37.8
	300	66.1

表8表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	E 成分
皮下	82.2%	83.3%	86.8%
経口	92.7%	86.8%	82.6%

DS 4152 および DP 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても受胎期卵巣組織を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用(%)の測定法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または経口内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%フェン

チナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期卵巣組織に添加し、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6時間経過後の血液を加えた場合の受胎期卵巣の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果を図9表の通りである。

実施例8

血管新生阻止作用(%)の測定法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン 50mg/kg の割合で用い、DS 4152 は30mg/kg または300mg/kg となるよう調整して加えた。また、比較として COP 4639 及び E 成分を用いた。この結果を図8表に示す。なお、投与の経路は、生理食塩水に同量投与した対照マウスより採取した血液を加えた受胎期卵巣の発達度を100%とした時の阻止率である。

経口マウスで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期卵巣組織に添加し、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6時間経過後の血液を加えた場合の受胎期卵巣の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果を図9表の通りである。

以下余白

実施例8

試験方法：

CS78L/8塩マウスに同系の母系由来区水腫部MS076を1×10⁶個皮下接種し、5日目より08 4152を30mg/kg 1日1回、6回皮下投与したところ、著名な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制) であり、かつノブイオン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍の長軸と短軸の長さを測定し、以下0式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法：

IC2系塩マウス (5週齢) にイルコーマ180 (8180) を1×10⁶個皮下接種し、3日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を250mg/kg/日0割合で3日間、100mg/kg/日0割合で1日投与した。

08 4152 は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/kgとなる1日1回皮下もしくは腹腔にて4日間投与した。移植7日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第11日に示す如く酢酸コナソンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに08 4152 を投与することにより腫瘍を増殖阻止作用が得ら

表10A

処置系	スプレッド		08 4152投与量 (mg/kg/day)	生存率抑制率 (%)
	物質名 (μmol)	投与量 (mg/kg)		
MS076	コナソリン(0.01)	0	0	27
	コナソリン(0.01)	1	30	78.1
	コナソリン(0.01)	0	30	-26
MS076	コナソリン(0.01)	0	0	71.7
	コナソリン(0.01)	1	30	-123
	コナソリン(0.01)	0	30	80.7
MS076	コナソリン(0.01)	0	0	40
	コナソリン(0.01)	1	30	82
	コナソリン(0.01)	0	30	18.4
MS076	コナソリン(0.01)	0	0	23.4
	コナソリン(0.01)	1	30	24.2
	コナソリン(0.01)	0	30	27.6

表10B

処置系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (T/C%) (a)	生存率 (b)
MS076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	08 4152投与群	30	309±0.09 (37)	33

(a) 移植21日目の平均腫瘍重量は対照群、(b) は平均重量0割合。
(c) (低投与量のノブイオン生存日数/対照群のノブイオン生存日数-1) × 100

れ、貯蔵時の減量率の 0.9 ~ 1.2 % であつた。

表 1.1 例

試 料	減 量 率	
	平均値 ± 標準偏差	%
生粗食塩水 (50)	Q381 ± Q191	1000
生粗食塩水 (50)	Q381 ± Q123	1000
酢酸ソーナツソ	Q340 ± Q182	943
0.1 4152 (Q61mg/..... 50)	Q381 ± Q070	1000
0.1 4152 (Q1mg/..... 50)	Q381 ± Q077	723
0.1 4152 (Q61mg/..... 50)	Q063 ± Q018	175
0.1 4152 (Q1mg/..... 50)	Q028 ± Q011	74
0.1 4152 (Q61mg/..... 50)	Q323 ± Q071	824
0.1 4152 (Q1mg/..... 50)	Q388 ± Q115	908
0.1 4152 (Q61mg/..... 50)	Q063 ± Q036	161
0.1 4152 (Q1mg/..... 50)	Q038 ± Q015	60

* F < 0.05, ** F < 0.01 スチューデント t 検定による

試料は試料用とする。

実例 1.2

試料:

0.1 4152 50mg, プレフェノロン 20mg, 乳糖 50mg, トウモロコシデンプン 1.5g, カルボキシメチルセルロースカルシウム 5mg, ヒドロキシプロピルセルロース 3mg 及びステアリン酸マグネシウム 0.5mg を常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図 1 の図を説明

図 1 をいし図 4 は高速ゲル濾過クロマトグラムである。

以 上

実例 1.0

試料:

0.1 4152 50mg, 乳糖 300mg, トウモロコシデンプン 1.44g, カルボキシメチルセルロースカルシウム 30mg 及びヒドロキシプロピルセルロース 30mg を用い、常法に従つて 500mg の錠剤を調製した。この錠剤は錠剤に於いて 1850.0mg ~ 8.1 を用用する。

実例 1.1

試料:

0.1 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム 90mg を試料用食塩水に溶解し、1.0ml とする。この溶液をノンブラフフィルタで濾過した後、アンプルに充填し、1.15℃ で 30 分間

図 1 例

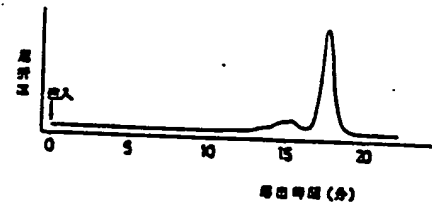
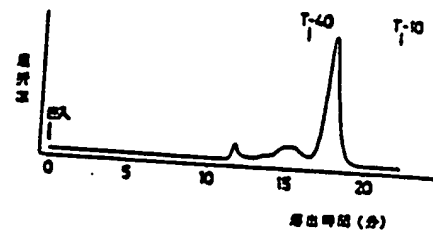
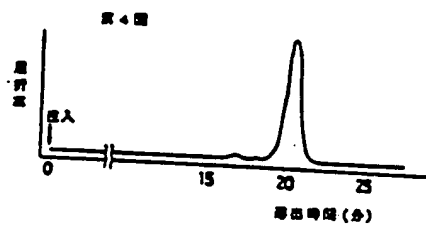
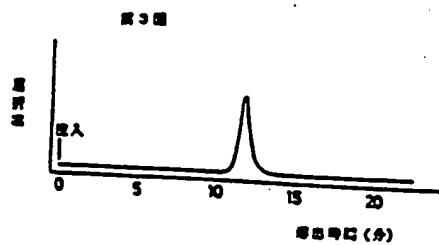


図 2 例



検出器 63-119500 (13)



第1頁の続き

④Int. Cl.°

A 61 K 31/723
37/02
C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
I(A 61 K 31/723
31:58)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8815-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

④発明者 小河 秀正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内